

تجزیه و تحلیل فیلوژنی ناحیه HVR1 از ژنوم میتوکندری در گوسفندان بومی نژاد شال و سنگسری ایران

آرزو محمدهاشمی^۱، مجتبی طهمورث پور^۱، نصرالله پیرانی^۲ و مریم نصرتی^۱

^۱ گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ^۲ گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۱a.mohammadhashemi@gmail.com

چکیده

گوسفند به عنوان حیوانی اهلی برای قرن ها نقش مهمی در تامین منابع غذایی مردمان سرزمین فلات ایران بر عهده داشته است و این منطقه به عنوان منشا این گونه به شمار می رود. توالی یابی ژنوم میتوکندری یکی از بهترین و رایج ترین روش ها برای طبقه بندی ژنتیکی جمعیت ها و گونه های نزدیک به هم می باشد. هدف از این تحقیق تعیین توالی ناحیه HVR1 از ژنوم میتوکندری نژاد های گوسفند بومی شال و سنگسری ایران بود. برای انجام این تحقیق ۲۰ نمونه خون از هر دو جنس از گوسفندان غیر خویشاوند جمع آوری شد. پس از استخراج DNA از آنها، ناحیه مورد نظر توسط پرایمرهای اختصاصی با تکنیک PCR تکثیر شده و تعیین توالی شد. سپس با مقایسه توالی ناحیه HVR1 بدست آمده از ژنوم گوسفند شال و سنگسری با توالی ناحیه مشابه از ژنوم گوسفندان سایر نژاد ها از گروه های مختلف، مشخص شد که این نژاد ها متعلق به گروه هاپلوتیپی A می باشند، همچنین مشابهت ژنتیکی آن ها با دو نژاد دیگر ایرانی (بلوچی و مغانی) ممکن است به دلیل نزدیکی جغرافیایی مکان زیستی آنها باشد.

واژگان کلیدی: آنالیز فیلوژنی، گوسفند نژاد سنگسری، گوسفند نژاد شال، ناحیه بسیار متغیر ۱، ژنوم میتوکندری

مقدمه

نگهداری و پرورش گوسفند در ایران به منظور تأمین پوست، گوشت، شیر و الیاف پشمی از سابقه ای طولانی برخوردار است اما در حال حاضر ایران نسبت به سایر کشورهای جهان با توجه به وسعت، تعداد گوسفند کمتری دارد و به دلیل تلاقی تلاقیهای کنترل نشده باعث از بین رفتن خلوص ژنتیکی شده است. این مسئله ضرورت استفاده از علم ژنتیک برای شناسایی دامهای پر تولید بیش از پیش احساس می شود. امروزه استفاده از ژنوم میتوکندری یکی از کاربردی ترین روش ها در بررسی های تنوع زیستی و ارزیابی بین گونه ها و نژادها محسوب می شود (گوها و همکاران ۲۰۰۶). منطقه D-Loop منطقه آغاز همانند سازی در ژنوم میتوکندری است و دارای دو ناحیه بسیار متغیر HVR1^۱ و HVR2^۲ است. این دو منطقه، هیچ پروتئینی را کد نمی کنند و در شروع رونویسی نقشی ندارند و جهش های ایجاد شده در آنها بدون تغییر به نسل های بعد منتقل می شود (سلطان و مانن ۲۰۰۴). شناسایی توالی این مناطق به عنوان مشخصه ژنتیکی ثابت محسوب می شود و می تواند به تهیه شناسنامه ژنتیکی و نگهداری خلوص نژادهای بومی کمک زیادی نماید. در ضمن با مقایسه توالی یک گونه یا نژاد با گونه ها و نژاد های دیگر که توالی آن ها در بانک ژن موجود است امکان مطالعات فیلوژنتیکی، بررسی اشتقاق گونه ها و محاسبه فاصله نسلی وجود دارد. از طرفی توالی یابی این مناطق شاخص مناسبی را از میزان تنوع موجود در جمعیت ارائه می دهد و امکان تشخیص گونه ها و نژاد ها را نیز فراهم می کند و می تواند نقش مهمی در جهت حفظ گونه های بومی از خطر

¹ Hypervariable Region-one

² Hypervariable Region-two

انقراض و اختلاط ژنتیکی با سایر نژادها کمک داشته باشد (هایندلدر و همکاران ۱۹۹۸). تا کنون چهار گروه هاپلوتیپی A، B، C و D در گونه گوسفند تشخیص داده شده است. لذا هدف از این تحقیق تعیین توالی بخش HVR1 ناحیه D- Loop ژنوم میتوکندری وزن به طول تقریبی ۴۲۰ جفت باز در دو نژاد گوشتی بومی ایران، نژاد سنگسری با خصوصیات خوب پروری و شال یکی از بهترین نژادهای سنگین و تعیین رابطه فیلوژنی این نژادها با سایر نژادها بود.

مواد و روش ها

برای اجرای این تحقیق نمونه خون از ۲۰ رأس قوچ و میش نژاد شال از ایستگاه تحقیقاتی مرکز تحقیقات قزوین و ۲۰ رأس گوسفند نژاد سنگسری از ایستگاه پرورش و اصلاح نژاد دامغان تهیه شد. استخراج DNA با استفاده از روش بیلز و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. برای آگاهی از میزان DNA و میزان خلوص و کیفیت آن از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و برای تعیین کمیت آن از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. جهت تکثیر اختصاصی ناحیه HVR1 از یک جفت پرایمر اختصاصی (5'-AGTATTGAGGACGGGGTAA-3') و (5'-TAACTGTGGGGGTAAGTATTT-3') که توسط نقاش و همکاران (۲۰۰۶) مورد استفاده قرار گرفته بود، استفاده شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز از کیت Genepak Universal استفاده شد. نمونه ها پس از تکثیر بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد اجرا شدند و سپس استخراج و خالص سازی قطعات مورد نظر از ژل با استفاده از کیت استخراج از ژل انجام گرفت. سپس نمونه ها جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن آلمان فرستاده شدند.

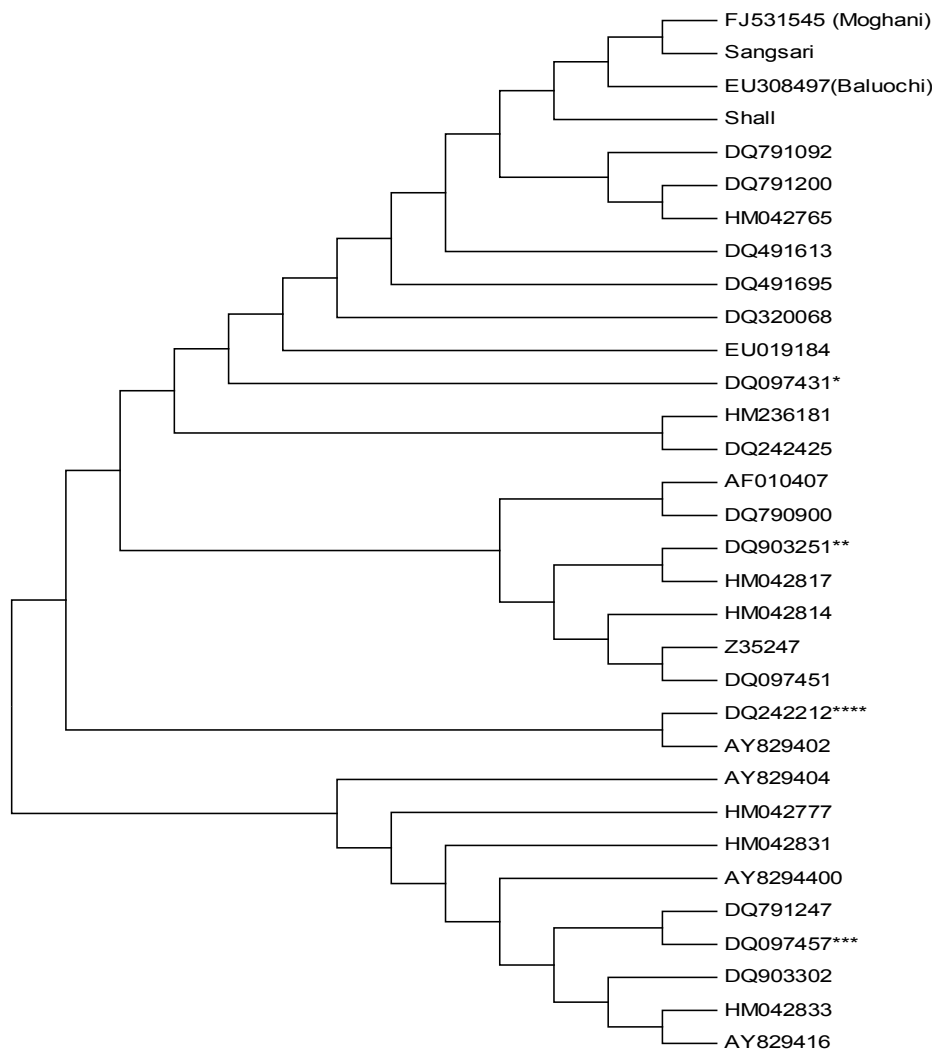
تجزیه و تحلیل توالی ها

جهت تجزیه و تحلیل توالی های بدست آمده از برنامه های نرم افزاری BioEdit، CLUSTAL W، MEGA 4 استفاده شد و توالی ها با یکدیگر و با سایر توالی های موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شدند. به منظور انجام مقایسات فیلوژنی از توالی ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری چندین نژاد مختلف گوسفند موجود در پایگاه اطلاعاتی بانک ژن استفاده شد. در نهایت درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor-joining (NJ) رسم گردید.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۴۲۰ جفت باز از ناحیه HVR1 ژنوم میتوکندری گوسفندان نژاد شال و سنگسری تعیین توالی شد. برای تعیین هاپلوتیپ ها از روش آنالیز ایندکس عدم توافق با استفاده از نرم افزار MEGA4 استفاده شد. در این روش تشخیص هاپلوتیپ بر اساس فاصله ترکیبات نوکلئوتیدی توالی ها انجام شد و تعداد ۹ هاپلوتیپ در گوسفند نژاد شال و ۷ هاپلوتیپ در گوسفند نژاد سنگسری بدست آمد. این تعداد هاپلوتیپ در مقایسه با تعداد کل نمونه ها می تواند نشان دهنده تنوع بالا در نمونه ها باشد. به عنوان مثال نقاش و همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از تکثیر و توالی یابی بخش HVR1 از D-loop ژنوم میتوکندری به طول ۴۸۰ جفت باز از گونه *Ovis orientalis* موجود در ترکمنستان، قزاقستان، تاجیکستان و پاکستان از تعداد ۲۲۱ نمونه فقط ۲۰ هاپلوتیپ تشخیص دادند. تنوع نوکلئوتیدی برای نژاد شال حدود ۰/۰۰۹۲ و در نژاد سنگسری ۰/۰۰۸۳ تعیین شد که بسیار نزدیک به این مقدار در گروه هاپلوتیپی A بود. به طور کلی تنوع نوکلئوتیدی در گروه هاپلوتیپی A حدود ۰/۰۱ و در گروه هاپلوتیپی B حدود نیز ۰/۰۱ و در گروه هاپلوتیپی C حدود ۰/۰۰۴ گزارش شده است (تاپو و همکاران ۲۰۰۶). تاکنون در گوسفندان اهلی (*Ovis orientalis*) چهار گروه هاپلوتیپی A، B، C و D تشخیص داده شده است. تعیین گروه هاپلوتیپی یکی از مهمترین مراحل در آنالیز این قبیل داده ها می باشد. با تعیین گروه هاپلوتیپی می توان موقعیت این نژاد در بین نژادهای دیگر را تعیین نمود و در نهایت برخی تغییرات در خصوصیات مورفولوژیکی نژادها را توجیه نمود. به منظور رسم نمودار فیلوژنی، ۴ توالی مرجع DQ097431=A، DQ097451=B، DQ097457=C،

DQ242212=D به عنوان تعیین کننده ۴ گروه هاپلوتیپی اصلی استفاده شدند (پدروزا و همکاران ۲۰۰۴) و توالی Consensus بدست آمده برای گوسفند سنگسری و شال با این توالی های مرجع و ۲۶ توالی ثبت شده دیگر در NCBI مقایسه شدند. نتایج آنالیز فیلوژنی اولاً مشخص کرد که گوسفندان شال و مغانی به همراه دو نژاد دیگر ایرانی (مغانی و بلوچی) که توالی آنها از NCBI استخراج شده بود، در گروه هاپلوتیپی A قرار دارند و ثانیاً در آنالیز فیلوژنی گوسفندان ایرانی با یکدیگر نزدیکی بیشتری دارد که این امر می تواند نشان دهنده منشا مشترک این نژاد ها با توجه به منطقه جغرافیایی محل زندگی نزدیک آنها باشد (شکل ۱).



شکل شماره ۱: نمودار درختی NJ رابطه فیلوژنیک توالی Consensus گوسفند نژاد شال و سنگسری و سایر نژادهای اخذ شده از بانک جهانی
ژن از جمله مغانی و بلوچی از ایران، علامت * توالی های شاخص، * مربوط به گروه A، ** گروه B، *** گروه C و **** گروه D



منابع و مراجع مورد استفاده

- Bailes, S.M., Devers, J.J., Kirby, J.D., Rhoads, D.D., 2007.** An expensive, simple protocol for DNA isolation from blood for high-throughput genotyping by polymerase chain reaction or restriction endonuclease digestion. *Poultry Science*. 86: 102- 106.
- Guha, S., Goyal, S.P., Kashyap, V.K., 2006.** Genomic variation in the mitochondrially encoded cytochrome b and 12s RNA genes. Characterization of eight endangered pecorn species. *Animal Genetics*. 37: 262-265.
- Hall, T.A., 1999.** BioEdit, a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 4: 95-98.
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Wassmuth, R., Janke, A., 1998.** The complete mitochondrial DNA sequence of the domestic sheep (*Ovis aries*) and comparison with the other major ovine haplotype. *Molecular Biology and Evolution*. 47: 441-448.
[http:// www. ncbi. nlm. nih. gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
- Tapio, M., Marzanov, N., Ozerov, M., Cinkulov, M., Kantanen J., 2006.** Sheep mitochondrial DNA variation in European, Caucasian, and central asia areas. *Molecular Biology and Evolution*. 23: 1776-1783.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.



Phylogenetic analyses of HVR1 region of mtDNA in Iranian Shall and Sangsari native sheep breeds

Arezoo Mohammadhashemi^{1*}, Mojtaba Tahmoorepour², Nasrollah Pirany³

¹a.mohammadhashemi@gmail.com

Abstract

Sheep as a domestic animal have played a key role in food resources of Iranian plateau people for centuries and this area is known as the origin of this spice. Among the genetic markers mtDNA sequencing is one of the most useful and common methods employed for inferring phylogenetic relationship among closely related species and population. This experiment carried out to determine the sequence of HVR1 from mtDNA in Iranian Sall and Sangsari sheep breeds. For this study 20 blood samples from unrelated Sall and Sangsari sheep breeds were collected. The DNA was extracted and the HVR1 region of mtDNA was amplified with specific primers using PCR. The HRV1 of mtDNA of Sall and Sangsari breeds were sequenced, alingned and compared with other breeds from all over the world. Results showed that this breeds belongs to haplotype group A and were nearest to other two Iranian sheep breeds (Moghani and Balochi) in which was predictable because of geographical vicinity of them.

Keywords: Phylogenetic analysis, Sangsari sheep breed, Shall sheep breed, HVR1 region